



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 33/53, C07K 15/14</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/07712</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Juli 1990 (12.07.90)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01585</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1989 (21.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 403.2 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BISSEN-DORF PEPTIDE GMBH [DE/DE]; Burgwedeler Straße 25, D-3002 Wedemark 2 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : STADLER, Herbert [DE/DE]; Obere Reihe 12, D-3402 Niemetal 2 (DE). FRITSCHE, Ulrich [DE/DE]; Brauweg 2, D-3400 Göttingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01585</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1989 (21.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 403.2 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BISSEN-DORF PEPTIDE GMBH [DE/DE]; Burgwedeler Straße 25, D-3002 Wedemark 2 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : STADLER, Herbert [DE/DE]; Obere Reihe 12, D-3402 Niemetal 2 (DE). FRITSCHE, Ulrich [DE/DE]; Brauweg 2, D-3400 Göttingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01585</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1989 (21.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 403.2 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BISSEN-DORF PEPTIDE GMBH [DE/DE]; Burgwedeler Straße 25, D-3002 Wedemark 2 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : STADLER, Herbert [DE/DE]; Obere Reihe 12, D-3402 Niemetal 2 (DE). FRITSCHE, Ulrich [DE/DE]; Brauweg 2, D-3400 Göttingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: ANTIGEN ASSOCIATED WITH DEGENERATIVE DISEASES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM (CNS), ANTIBODY WHICH REACTS WITH SAID ANTIGEN AND METHOD FOR DIAGNOSING DYSFUNCTIONS OF THE CNS</p> <p>(54) Bezeichnung: ANTIGEN, ASSOZIIERT MIT DEGENERATIVEN ERSCHEINUNGEN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS (ZNS), DAGEGEN GERICHTETE ANTIKÖRPER SOWIE VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON DYSFUNKTIONEN DES ZNS</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="text-indent: 20px;">In a method of diagnosing dysfunctions of the central nervous system by means of an antigen/antibody complex, the diagnosticum is an antibody which reacts with a heparan sulphate proteoglycan from cranial nerve endings which has a molecular weight of 400,000 to 1,000,000 and its proteolytic fragments, preferably an antibody from the mAb-SG cell line, deposited by the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, England under the number 88 122 108. The test sample is derived from liquor or serum. The diagnostic method is suitable for diagnosis of Alzheimer's disease, brain tumours, general disorders of the cranial circulation, trisomy 21 and Jakob-Creutzfeld syndrome and other degenerative diseases of the central nervous system.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="text-indent: 20px;">Es wird ein Verfahren zur Diagnose von Dysfunktionen des zentralen Nervensystems mittels eines Antigenantikörperkomplexes beschrieben. Das Diagnoseverfahren benutzt als Diagnostikum einen Antikörper gegen ein Heparansulfatproteoglycan aus Hirnnervenenden mit einem Molekulargewicht von 400.000 bis 1.000.000 und dessen proteolytische Fragmente, vorzugsweise Antikörper aus der Zelllinie mAb-SG, hinterlegt bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, England unter der Nummer 88 122 108. Die zur Untersuchung zu verwendende Probe stammt dabei aus Liquor oder Serum. Das diagnostische Verfahren eignet sich zur Diagnose von Alzheimer's Demenz, Gehirntumoren, allgemeinen Bluthirnschrankstörungen, Trisomie 21 sowie Jakob-Creutzfeld-Syndrom und anderen degenerativen Erscheinungen des zentralen Nervensystems.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Antigen, assoziiert mit degenerativen Erscheinungen des zentralen Nervensystems (ZNS), dagegen gerichtete Antikörper sowie Verfahren zur Diagnose von Dysfunktionen des ZNS

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antigen, das mit degenerativen Erscheinungen des zentralen Nervensystems (ZNS) assoziiert ist und zur Klasse der Heparansulfatproteoglycane gehört und aus Hirnnervenendungen stammt, dagegen gerichteten Antikörpern sowie ein Verfahren zur Diagnose von Dysfunktionen des ZNS.

15 In den letzten Jahren ist im zunehmenden Maße deutlich geworden, daß viele neurologische Degenerationserscheinungen, die früher als altersbedingt hingenommen worden sind, tatsächlich als Erkrankungen aufzufassen sind. So wurde beispielsweise noch Anfang des 19. Jahrhundert die Anschauung vertreten, daß hohes Alter geradezu zwangsläufig zur Demenz führen würde. M.Allard, J.L. Signoret und D.Stalleicken beschreiben so zum Beispiel in der Monographie "Alzheimer Demenz", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, daß sich die Einstellung zu der Altersdemenz allmählich änderte, nachdem 20 anatomisch-pathologische Untersuchungen zeigten, daß das Gehirngewebe älterer Menschen mit Demenzsymptomen ebenfalls die charakteristischen Zeichen der Alzheimer Krankheit aufwiesen und daß sogar bei asymptomatischen älteren Patienten diese histologischen Veränderungen nachweisbar sind. Diese histologischen Veränderungen, beispielsweise neuritische Plaques (senile Drusen) sowie Alzheimer-Fibrillenveränderungen 25 korrelieren mit dem Ausmaß der Demenz. Trotz aller Fortschritte in der Neurologie beruht die Diagnose dieses auf degenerativen Erscheinungen des zentralen Nervensystem beruhenden Krankheitsbildes, lediglich 30

auf einer Ausschlußdiagnose (siehe Seite 4 der oben genannten Monographie). Die Autoren fordern eine genaue und frühzeitige Diagnose, hier im speziellen der Alzheimer'schen Demenz, insbesondere da diese Erkrankung aufgrund der sich positiv verändernden Lebenserwartung in Zukunft sich noch stärker in den Brennpunkt des klinischen Interesses schieben wird (siehe Seite 61 der oben angegebenen Monographie).

Die Ursachen degenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems sind nicht bekannt, so daß die kausale Entwicklung eines Diagnostikums nicht möglich ist. Die morphologischen Erscheinungen im Zuge der Progredienz der Degeneration des ZNS sind hingegen meist gut bekannt (Morbus Alzheimer, Trisomie 21, Jakob-Kreuzfeld-Syndrom und andere).

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe ist es, ein Diagnoseverfahren bereitzustellen, mit dessen Hilfe es möglich wird, degenerative Erkrankungen frühzeitig und sicher zu diagnostizieren. Eine weitere Aufgabe ist die Bereitstellung eines einfachen, gegebenenfalls automatisierbaren Verfahrens zur Durchführung von Reihenversuchen unter Anwendung konventioneller Analysenmethoden, insbesondere immunologischer Methoden. Dazu ist es erforderlich ein Antigen zu finden, welches mit der jeweiligen Erkrankung eindeutig korreliert ist. Desweiteren muß ein gegen dieses Antigen gerichteter Antikörper hergestellt werden, der das mit der Erkrankung korrelierte Antigen anzeigt.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß ein Heparansulfatproteoglycan aus Hirnnervenenden mit einem Molekulargewicht von 400.000 bis 1.000.000 (400 bis 1.000 KD) und dessen proteolytische Fragmente indikativ für degenerative Zustände des ZNS sind. David Schubert et al. beschreiben in Science 241, pp. 223

- 5 bis 226 ein Heparansulfatproteoglycankernprotein aus Zellen der Nervenzelllinie PC12 mit einem Molekulargewicht von etwa 200.000 Dalton. Die Autoren beschreiben weiterhin eine auffällige Sequenzanalogie dieses Proteoglycans mit dem menschlichen Amyloid Betaproteinvorläufermolekül.
10. Selkoe et al. beschreiben in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, pp 7341 bis 7345, 1988 ein Betaamyloidvorläuferprotein der Alzheimer'schen Krankheit mit einem Molekulargewicht von 110.000 bis 135.000 Dalton als Membran assoziiertes Protein in Nerven und Nichtnervengewebe. Die Identifizierung dieses Vorläuferproteins geschah immunologisch durch Reaktion mit Antikörpern, die gegen synthetische Peptide aus der Sequenz des Betaamyloid precursor protein, dessen Aminosäuresequenz bekannt war, gerichtet war.
- 15
- 20 Paulsson, Mats et al. beschreiben in J. Mol. Biol. 1987, 297-313, ein Heparansulfatproteoglycan mit einem Molekulargewicht von ungefähr 500.000. Allerdings stammt dieses Heparansulfatproteoglycan aus Basismembranen von Mäusetumoren. Es werden dort ebenfalls strukturelle Merkmale dieses Heparansulfatproteoglycans beschrieben. Aufgrund vergleichender Untersuchungen mit anderen Formen von Basismembran-Heparansulfatproteoglycanen folgern die Autoren, daß Heparansulfatproteoglycane aus Basismembranen aufgrund ihrer genetischen Unterschiedlichkeit nicht
- 25
- 30 von gemeinsamen Vorläufern abstammen.

Das erfindungsgemäße Heparansulfatproteoglycan stammt jedoch aus Hirnnervenendungen und hat ein Molekulargewicht von 400.000 bis 1.000.000. Proteolytische

Fragmente des erfindungsgemäßen Heparansulfatproteoglycans weisen ein Molekulargewicht von 50.000 bis 200.000 auf. Das erfindungsgemäße Heparansulfatproteoglycan ist membranständig, während die entsprechenden Fragmente insbesondere im physiologischen Milieu der Körperflüssigkeit löslich sein können. Ein weiteres Merkmal des Heparansulfatproteoglycans gemäß der Erfindung ist seine immunologische Reaktion mit Antikörpern der Antikörperzelllinie mAb-SG (ECACC 88 122 108). Das erfindungsgemäße Heparansulfatproteoglycan ist erhältlich durch Gewinnung von Vesikeln aus Hirnnervenenden, die zuvor aus Hirnsubstanz angereichert worden sind und gelchromatographisch in Fraktionen getrennt werden, wobei solche Fraktionen mit einem Molekulargewicht über 300.000 gesammelt werden. Zur Isolierung des Heparansulfatproteoglycans wurde Schweinehirn homogenisiert.

Das Homogenat wurde bei niedriger Drehzahl, vorzugsweise 3.000 UPM für einige Minuten, vorzugsweise 10 Minuten, zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und einer Zentrifugation bei höherer Drehzahl, vorzugsweise 12.000 UPM für längere Zeit als im vorhergehenden Schritt, vorzugsweise 1 Stunde, unterworfen. Das Sediment dieses Zentrifugationsschrittes wurde gesammelt und einer Dichtegradienten-Zentrifugation unterworfen. Vorzugsweise wurde ein diskontinuierlicher Dichtegradient verwendet. Besonders bevorzugt ist ein diskontinuierlicher Dichtegradient aus drei Zonen mit 0,32 M Saccharose gefolgt von 0,8 M Saccharose und 1,2 M Saccharose. Man zentrifugiert bei höherer Drehzahl, vorzugsweise 21.000 UPM für einige Stunden, vorzugsweise 2 Stunden, sammelt die Zonen zwischen 0,8 und 1,2 M Saccharose, verdünnt in geeignetem Puffer, vorzugsweise 0,16 M Natriumchlorid und zentrifugiert ein weiteres Mal vorzugsweise bei

12.000 UPM für eine Stunde. Das Sediment wird einem osmotischen Schock ausgesetzt durch Rehomogenisierung im Wasser. Erneute Zentrifugation, vorzugsweise bei 5 12.000 UPM für die Dauer von eine Stunde liefert einen Überstand, welcher nach Trennung vom Sediment nochmals vorzugsweise bei 35.000 UPM mindestens 8 Stunden lang zentrifugiert wird. Das danach erhaltene 10 Sediment enthält in hinreichender Reinheit die benötigte Vesikelfraktion. Die Figur 1 zeigt ein Aufarbeitungsschema zur Gewinnung der Vesikel.

Die wie oben beschrieben gewonnenen synaptischen Vesikel aus Schweinehirn wurden in Natrium-Dodecylsulfat 15 gelöst und mit Hilfe der Gelfiltration, vorzugsweise an Acrylamid/Agarose als Trennmatrix chromatographiert. Die im Ausschlußvolumen der Säule eluierende Fraktion, enthaltend Glycosaminoglycan, wurde gesammelt und weiterhin verwendet. Die Glycosaminoglycanbestimmung erfolgte nach Barthold et al. (Anal. 20 Biochem. 150, 320 - 324 (1985)). Ein typisches Chromatogramm der Glycosaminoglycanverteilung zeigt die Abbildung 2a. Abbildung 2b zeigt, daß die proteinhaltige Hauptfraktion nicht im Ausschlußvolumen V_0 eluiert. 25

Die so gereinigte Fraktion wird zur Gewinnung von Antikörpern gemäß der Methode von Köhler und Milstein verwendet. Vorzugsweise werden die in Maus erzeugten 30 Zellen mit der Mausmyelomazelle PAI fusioniert (siehe Research Disclosure, Mai 1982, pp 155 bis 157, Referat 21713). Zum Screening geeigneter Klone kann in vorteilhafter Weise die Immunocytochemie am Rückenmark der Ratte oder am elektrischen Organ des Zitterrochens (*Torpedo marmorata*) eingesetzt werden. Die

5 Klonierung und Subklonierung führt dann zu einem besonders bevorzugten Klon, der als Hybridomazelllinie unter der Bezeichnung mAb-SG unter der Nummer 88 122 108 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP 4 OJG, England hinterlegt worden ist. Die monoklonaren Antikörper des hinterlegten Klones mAb-SG sind gegen ein zuckerhaltiges Epitop gerichtet. Neben diesem Klon sind auch andere Klone vorhanden, die gegen Epitope des erfindungsgemäßen Heparansulfatproteoglycans gerichtet sind. Besonders bevorzugte Antikörperpopulationen zeigen keine Kreuzreaktion mit Glycosaminoglycanseitenketten des Heparansulfatproteoglycans bzw. Heparansulfat und/oder gereinigten Heparansulfatproteoglycanen aus Engelbeth-Holm-Swarm Sarcomazellen. Die Antikörper der Zelllinie mAb-SG wurden als zur IgM-Klasse zugehörig klassifiziert. Mit dem so gewonnenen erfindungsgemäßen Antikörper läßt sich ein Antigen im Rattenhirn nachweisen, das als "Synaptoglycan" bezeichnet wird (siehe Abbildungen 3 und 4). Dieses Antigen ist wasserlöslich. Das mit dem Antikörper reagierende Antigen (SG) läßt sich im Rattenhirn auch in membran- gebundener Form nachweisen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die membrangebundene Form aus synaptischen Vesikelmembranen stammt.

30 Die Abbildung 5 veranschaulicht wie das Antigen an der Außenseite der Nervenmembran erscheinen kann. In den Vesikeln ist das Antigen an der inneren Membran gebunden. Verschmilzt nun die axonale Nervenzellmembran am synaptischen Ende der Zelle mit den Vesikeln, bildet die Vesikelinnenseite nach Verschmelzung einen Teil der Membranaußenseite.

Das Antigen wurde mittels Immunoblotting-Technik auch im Gehirnhomogenaten von Primaten, Säugetieren, wie Ratte und Schwein, sowie anderen Wirbeltieren, wie Huhn, nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden Leber- und Nierenzellenhomogenate der Ratte auf immunologische Reaktion mit dem Antikörper gemäß der Erfindung untersucht. Dabei zeigte sich keine positive Reaktion.

Auch in Zellkulturen von PC12 (Phäochromozytoma-Zellen) sowie neuronalen Zellkulturen des optischen Tectums des Huhns konnte eine immunologische Reaktion des erfindungsgemäßen Antikörpers gefunden werden (siehe Abbildung 6).

Die Eignung des erfindungsgemäßen Antikörpers zur Anwendung im erfindungsgemäßen Verfahren zur Diagnose von Dysfunktionen des zentralen Nervensystems, bedingt durch degenerative Zustände des zentralen Nervensystems, ergibt sich aus dem überraschenden Befund, daß der erfindungsgemäße Antikörper mit Antigenen aus Körperflüssigkeit, wie Liquor und Serum bei Patienten mit entsprechenden Symptomen der Erkrankungen des ZNS immunologisch reagiert. Außerdem wurde der Antikörper-Antigenkomplex bei Dünnschnitten von post mortem entnommenen Gehirnen eines Alzheimer's Patienten durch Einfärbung der extrazellulären Plaques, insbesondere in der Peripherie der Ablagerungen, identifiziert.

Mit der Immunblot-Technik kann das Antigen in verdünntem Liquor nachgewiesen werden. Es ergibt sich ein charakteristisches Bandenmuster von meist 4 Banden von 200.000 Dalton bis 50.000 Dalton. Das Bandenmuster variiert in der Intensität und Zusammensetzung

5 je nach Patient sehr stark (Abbildung 7). Diese Ban-
den sind Degenerationsprodukte des nativen Antigens.
Abweichungen in Intensität und Muster wurden insbe-
sondere erhalten bei Bluthirnschrankenstörungen, Ge-
hirntumoren, senilen Dementien, insbesondere des
10 Alzheimer Typs und bei Parkinsonismus. Ebenso besteht
hier nach Alter der Patienten die Tendenz zur Zunahme
des Antigens im Liquor bei höherem Alter. Das Antigen
SG ist auch in humanem Serum präsent, jedoch in erheb-
lich geringerer Konzentration als im Liquor.

15 In bevorzugter Weise kann man den diagnostischen
Test in quantitativer Form durchführen mittels "Dot
assay". Dazu wird antigenhaltiges Material auf Nitro-
cellulosefilter getüpfelt. Die Nitrocellulose kann
mit konzentrierter proteinhaltiger Lösung, vorzugs-
weise fötalem 10 % Kälberserum, 0,5 % Albumin, 0,05 %
20 Milchpulver gesättigt werden. Danach inkubiert man
mit radioaktiv markierten Antikörpern (Methode nach
Bolton und Hunter). Nach Auswaschen des nichtgebun-
denen radioaktiv markierten Antikörpers, wird die an
Nitrocellulose gebundene Radioaktivität im Gamma-
Zähler ausgezählt. Aus Eichkurven ergibt sich eine
25 Linearität des Tests von Antigen im Nanogramm-Bereich
bis 10 μ m Antigen. In diesen Meßbereichen wird bei
der quantitativen Auswertung von Proben gearbeitet.
Das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren ist zur Erken-
nung degenerativer Erscheinungen des ZNS geeignet.
30 Insbesondere lassen sich Alzheimer's Demenz, Gehirn-
tumoren, Bluthirnschrankenstörungen, Trisomie 21,
Jakob-Creutzfeld-Syndrom u. a. diagnostizieren. Als
Nachweisverfahren läßt sich neben dem oben beschrie-
benen Immunoblotting und Radioimmunoassay auch ein
Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) durch-
führen.

Der erfindungsgemäße Antikörper ist also in hervorragenderweise geeignet als Diagnostikum zur Durchführung des Verfahrens zur Diagnose von Dysfunktionen des ZNS zu dienen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

10

Beispiel 1Isolierung des Heparansulfatproteoglycan aus antigenhaltigen Vesikeln aus Schweinehirnnervenenden

15

20

25

30

Schweinehirn wurde homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 3.000 UPM 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und einer Zentrifugation bei 12.000 UPM für 1 h unterworfen. Das Sediment dieses Zentrifugationsschrittes wurde gesammelt und einer Dichtegradienten-Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten unterworfen. Der diskontinuierliche Dichtegradient bestand aus drei Zonen, 0,32 M Saccharose gefolgt von 0,8 M Saccharose und 1,2 M Saccharose. Man zentrifugierte bei 21.000 UPM für 2 h, sammelte die Zonen zwischen 0,8 und 1,2 M Saccharose, verdünnte in 0,16 M Natriumchlorid und zentrifugierte ein weiteres Mal bei 12.000 UPM für 1 h. Das Sediment wurde durch Rehomogenisierung in Wasser einem osmotischen Schock ausgesetzt. Erneute Zentrifugation bei 12.000 UPM für die Dauer von 1 h lieferte einen Überstand, welcher nach Trennung vom Sediment nochmals bei 35.000 UPM über Nacht zentrifugiert wurde. Das danach erhaltene Sediment enthielt in hinreichender Reinheit die benötigte Vesikelfraktion.

Die so gewonnenen synaptischen Vesikel wurden in Natrium-Dodecylsulfat gelöst und an Acrylamid/Agarose an einer AcA-34-Säule chromatographiert. Die im Ausschlußvolumen der Säule eluierende Fraktion wurde gesammelt und weiter bearbeitet. Die Glycosaminoglycanbestimmung erfolgte nach Barthold et al. Anal. Biochem. 150, 320 - 324 (1985). Die Ergebnisse dieser chromatographischen Reinigungsschritte sind in Abbildung 2 a, b wiedergegeben.

Beispiel 2

Gewinnung monoklonaler Antikörper und Screening von Klonen

Die nach der Fusion mit der Hybridomatechnik erhaltenen Klone wurden mittels Dot-Blot, Immunblot und Immunocytochemie an Dünnschnitten von Rattenhirn getestet. Bei den immunochemischen Versuchen wurde als Antigen das zum Immunisieren verwendete Material eingesetzt. Bei der Fusion entstanden 300 Klone, etwa 100 davon waren im Dotblot positiv und diese wurden durch Immunocytochemie am Rückenmark der Ratte und am cholinergen elektrischen Organ von Torpedo marmorata überprüft und 10 Klone als geeignet ausgewählt. Das weitere Screening erfolgte durch Immunblotting. Schließlich wurde ein Klon ausgewählt und durch Vereinzelnung zwei Mal subkloniert. Es wurden Verdünnungen 1 : 5 und 1 : 10 verwendet. Der resultierende Klon zeigte nach der zweiten Subklonierung die ursprünglich erhaltenen Resultate. Die Antikörperklasse wurde als IgM bestimmt (Biorad Dot-Blot Assay zur Bestimmung der Immunglobulinklasse). Dieser monoklonale Antikörper wird im weiteren als mAb-SG bezeichnet, das zugrunde liegende Antigen als Synaptoglycan (SG).

Beispiel 3Charakterisierung von Synaptoglycan, Isolierung aus Rattenhirn

5

10

15

20

25

6 Rattenhirne (frisch) werden in 20 Volumina 0,15 M Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat pH 7,4 (PBS-Puffer) homogenisiert. Daraus wird nach Zentrifugation für 2 Stunden bei 100.000 g ein Überstand erhalten, der mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung 1 : 1 gemischt wird. Nach einer Stunde bei wird bei 20.000 g (4°C) für eine Stunde zentrifugiert und der Niederschlag in PBS gelöst und auf Sephacryl S-300 (Pharmacia, Säulendimension 100 x 1,5 cm) in PBS chromatographiert (Chromatogramm siehe Abbildung 3). Peak I (Absorption 280 nm) wird gesammelt und weiter auf einer Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephacryl, Pharmacia, 20 x 1 cm) gereinigt. Nach Auftragung des Materials auf die Säule wird mit 10 Säulenvolumina PBS gewaschen und mit einem Gradienten aus PBS und PBS in 1,2 M Natriumchlorid eluiert. Das Antigen eluiert bei etwa 0,5 M Natriumchlorid und wird gemäß Immunoblot-Technik mit mAb-SG detektiert. Die SG-enthaltenden Fraktionen besitzen über 90 % Reinheit.

Chemische, enzymatische und physikalische Charakterisierung

30

SG wird mit salpetriger Säure behandelt. Diese Technik ist spezifisch für Proteoglycane des Heparansulfattyps. SG ist ein Heparansulfatproteoglycan, gemäß Abbau mit salpetriger Säure. Im Hydrolysat von gereinigtem SG (6 N Salzsäure 24 Stunden bei 105°C) wird Glucosamin nachgewiesen. Ebenso werden in SG Zucker vom Glucuronsäuretyp nachgewiesen. Diese Zucker sind

5 charakteristisch für HSPG (Heparansulfatproteoglycan). SG wird von Glykosidasen, die O-glykosidisch gebundene Zucker angreifen, nicht verdaut. Die scheinbare molare Masse von SG ergibt sich aus der SDS Polyacrylamidgelelektrophorese und aus Gelchromatographie zu ungefähr 300.000 bis 1.000.000 Dalton. SG erfüllt die Charakteristika eines Heparansulfatproteoglycans. Das Epitop des Anti-SG Antikörpers (mAb-SG) ist mit dem Carbohydratanteil, zumindest teilweise, assoziiert.

Beispiel 4

Präsenz von SG in verschiedenen Geweben und Gewebsflüssigkeiten

Immunblot-Technik mit mAb-SG

20 SG findet sich in Gehirnhomogenaten von Mensch, Ratte, Schwein und Huhn. In Leber- und Nierenhomogenaten ist das Antigen direkt nicht nachweisbar, ist daher entweder nicht oder in vergleichsweise kleinen Konzentrationen vorhanden. SG ist in Überständen sowie in Zellen von Phäochromozytomazellen (PC 12) sowie in Neuronen-Kulturen vom optischen Tektum des Huhns nachweisbar.

Immunocytochemie mit mAb-SG

30 Im Rattenhirn wird eine synapsenspezifische Färbung erhalten. Es werden jedoch nicht alle Synapsen angefärbt. In Zellkulturen von PC 12-Zellen und Huhn optischen Tektum (Abbildung 6) werden Zellkörper und Neuriten angefärbt.

Humanes Serum und Liquor:

5 Mit der Immunblot-Technik wird in 1 : 1 verdünntem
Liquor deutliche Reaktion erhalten. Es ergibt sich
ein charakteristisches Bandenmuster von 4 Banden von
200.000 bis 50.000 Dalton, das in Intensität und Zu-
sammensetzung je nach Patient stark von einander ab-
10 weicht (siehe Abbildung 7). Diese Banden sind Dege-
nerationsprodukte des nativen SG. Abweichungen in
Intensität und Muster wurden insbesondere erhalten
bei Blut-Hirnschrankenstörungen, Gehirntumoren, se-
nilen Dementien insbesondere des Alzheimertyps und
bei Parkinsonismus. Ebenso besteht je nach Lebens-
15 alter der Patienten die Tendenz zur Zunahme des SG-
Antigens im Liquor bei höherem Alter. SG ist auch in
humanem Serum präsent, jedoch in erheblich geringerer
Konzentration als im Liquor.

Beispiel 5

20

Quantitativer immunchemischer Test für SG mit mAb-SG

25 Zur quantitativen Bestimmung von SG im Serum und im
Liquor und anderen Gewebsflüssigkeiten und Geweben
wurde ein Dot-Assay durchgeführt. Antigenhaltiges
Material wird auf Nitrocellulosepapier getüpfelt,
die Nitrocellulose dann mit konzentrierter protein-
haltiger Lösung (10 % fötales Kälberserum, 0,5 %
30 Albumin, 0,05 % Milchpulver) gesättigt und dann mit
¹²⁵J markiertem mAb-SG (Methode nach Bolton und
Hunter) inkubiert. Nach auswaschen des nicht gebunde-
nen radioaktiven markierten mAb-SG wird die an Nitro-
cellulose gebundene Radioaktivität im Gamma-Zähler
ausgewertet. Aus Eichkurven ergibt sich eine Linearität
des Tests im Bereich von einem Nanogramm SG bis
10 µg des Antigens.

Beispiel 6

5 Der Antikörper mAb-SG zeigt bei Dünnschnitten von
post mortem Gehirnen von Alzheimer Patienten Anfär-
bung der extrazellulären Plaques, insbesondere in
der Peripherie der Ablagerungen.

10

15

20

25

30

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Heparansulfatproteoglycan aus Hirnnervenendungen mit einem Molekulargewicht von 400.000 bis 1.000.000 (400 bis 1.000 KD) und dessen proteolytische Fragmente.
- 10 2. Heparansulfatproteoglycan nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das proteolytische Fragment ein Molekulargewicht von 50.000 bis 200.000 (50 bis 200 KD) aufweist.
- 15 3. Heparansulfatproteoglycan nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es membranständig ist.
- 20 4. Heparansulfatproteoglycanfragment nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es im physiologischen Milieu der Körperflüssigkeiten löslich ist.
- 25 5. Heparansulfatproteoglycan nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es immunologisch mit dem Antikörper aus der Antikörperzelllinie C 98 unter Bildung eines Antigen/Antikörperkomplexes reagiert.
- 30 6. Heparansulfatproteoglycan gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 erhältlich durch Gewinnung von Vesikeln aus Hirnnervenenden, die zuvor aus Hirnsubstanz angereichert worden sind und gelchromatographisch in Fraktionen getrennt werden, wobei solche Fraktionen mit einem Molekulargewicht über 300.000 (300 KD) gesammelt werden.
7. Antikörper gegen ein aus einer Hirnnervenendenfraktion stammendem Antigen mit einem Molekulargewicht von über 300.000 (300 KD).

8. Antikörper nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Heparansulfatproteoglycan aus einer Hirnnervenendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 gerichtet ist.
- 5
9. Antikörper nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein carbohydrathaltiges Epitop des Heparansulfatproteoglycan nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gerichtet ist.
- 10
10. Antikörper nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er nicht gegen die Glycosaminglycan-Seitenketten des Heparansulfatproteoglycan gerichtet ist und keine Kreuzreaktion mit Heparansulfat und/oder gereinigtem Heparansulfatproteoglycan aus Engelbeth-Holm-Swarm Sarcomazellen zeigt.
- 15
11. Antikörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er aus der Hybridoma-Zelllinie mAb-SG (ECACC 88 122 108) stammt.
- 20
12. Antikörper nach einem der Ansprüche 7 bis 11 erhältlich durch Immunisierung eines geeigneten Tieres mit Fraktionen aus Hirnnervenenden mit einem Molekulargewicht von über 300.000 (300 KD).
- 25
13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Tier mit einem Heparansulfatproteoglycan nach einen der Ansprüche 1 bis 6 immunisiert wird.
- 30
14. Antikörper nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß er zur IgM Klasse gehört.

- 5 15. Verfahren zur Diagnose von Dysfunktionen des ZNS
mittels eines Antigen/Antikörperkomplexes, da-
durch gekennzeichnet, daß
- a) eine aus Liquor oder Serum stammende Probe
mit
- 10 b) dem Antikörper gemäß einem der Ansprüche 7
bis 14 inkubiert und
- 15 c) der sich bildende Antigen/Antikörperkomplex
durch ein an sich bekanntes Nachweisverfahren
erfaßt wird, wodurch die Dysfunktion positiv
diagnostiziert wird.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 15 zur Diagnose degenera-
tiver Erscheinungen des ZNS.
- 25 17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16 zur Diagnose
von Alzheimer's Disease, Gehirntumoren, Blut-
Hirnschrankenstörungen, Trisomie 21 (Down Syn-
drome), Jakob-Creutzfeld-Syndrom.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,
wobei die Detektion des Antigens nach einem der
Ansprüche 1 bis 6 mittels Immunoblotting, Radio-
immunoassay (RIA), Enzyme Linked Immunosorbent-
Assay (ELISA) durchgeführt wird.
19. Diagnostikum zur Durchführung des Verfahrens
nach einem der Ansprüche 15 bis 18, im wesentli-
chen bestehend aus dem Antikörper gemäß einem
der Ansprüche 7 bis 14.

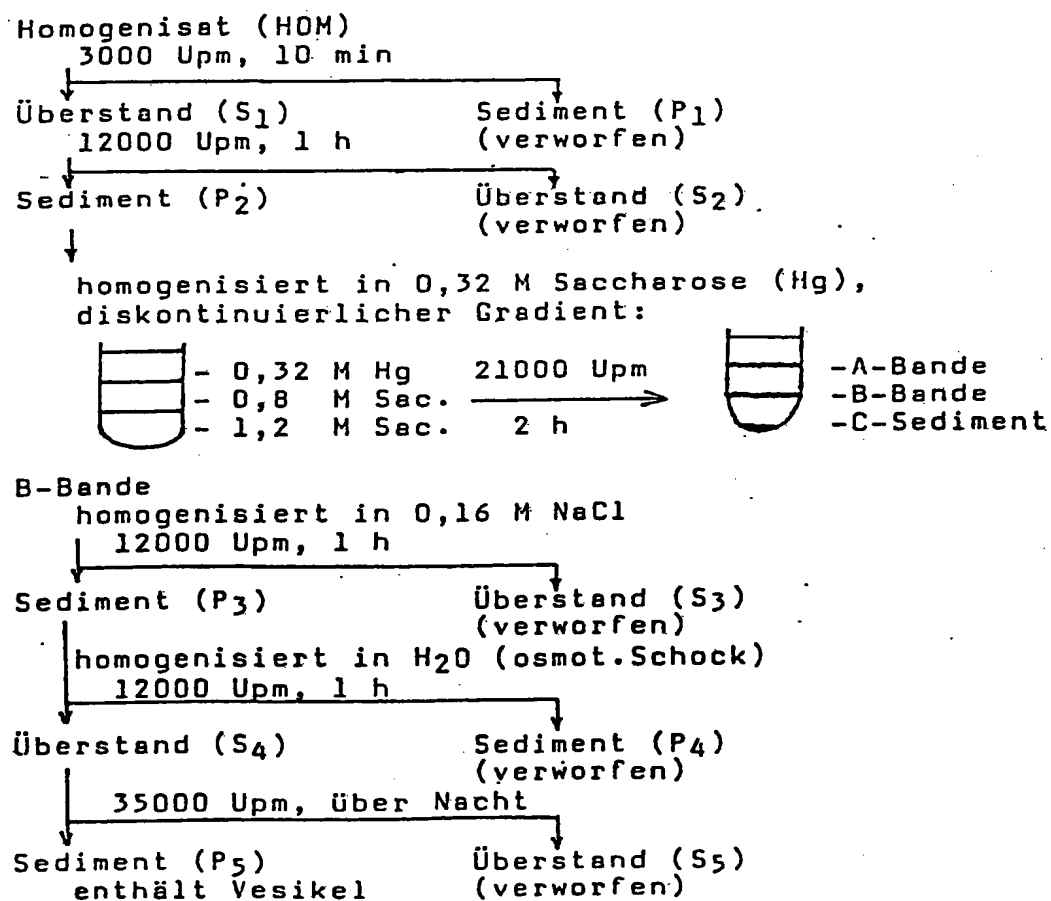
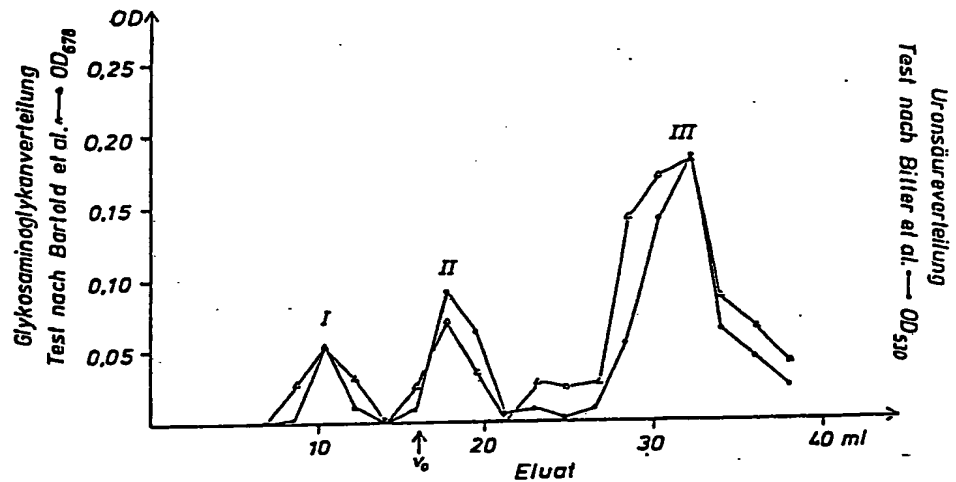
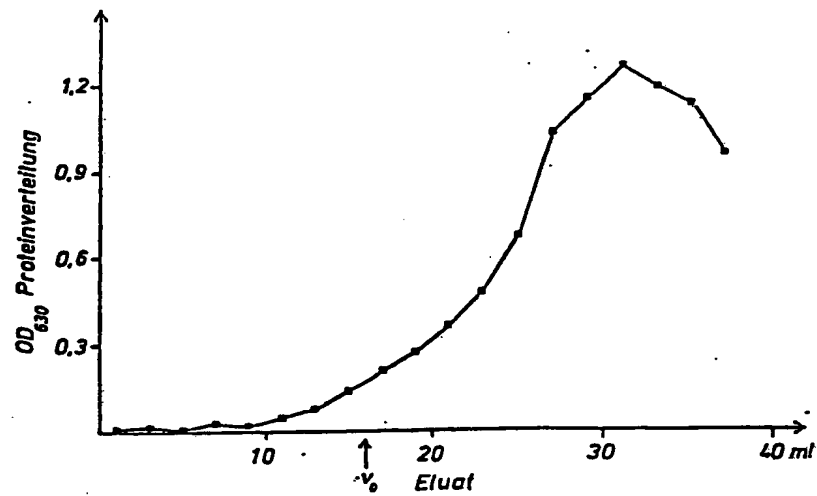


Abb. 1: Schematische Darstellung der Vesikelisolierung aus Schweinehirnen (Sac: Saccharose)

2/7



a



b

Abb. 2 : Glykosaminoglykan- und Uronsäureverteilung der synaptischen Vesikel nach der Gelfiltration mit einer AcA-34-Säule (Abb. 2 a) und deren Proteinverteilung (Abb. 2 b)
 (V_0 : Ausschlußvolumen
 I, II, III: Nummerierung der Uronsäuregipfel)

Peak I enthält das Antigen und wurde zur Immunisierung verwendet.

3/7

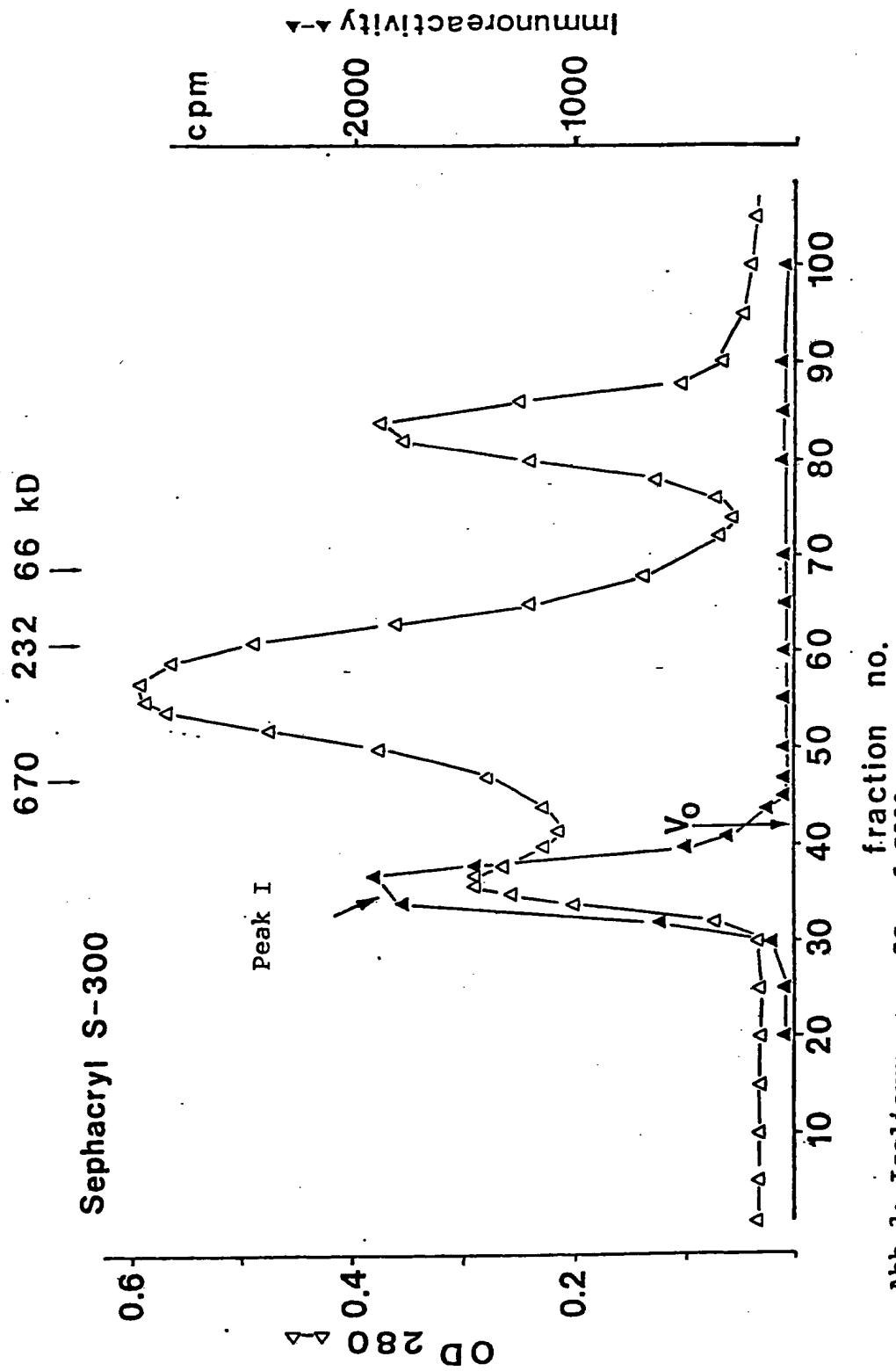


Abb.3: Isolierung von SG auf S300

4/7

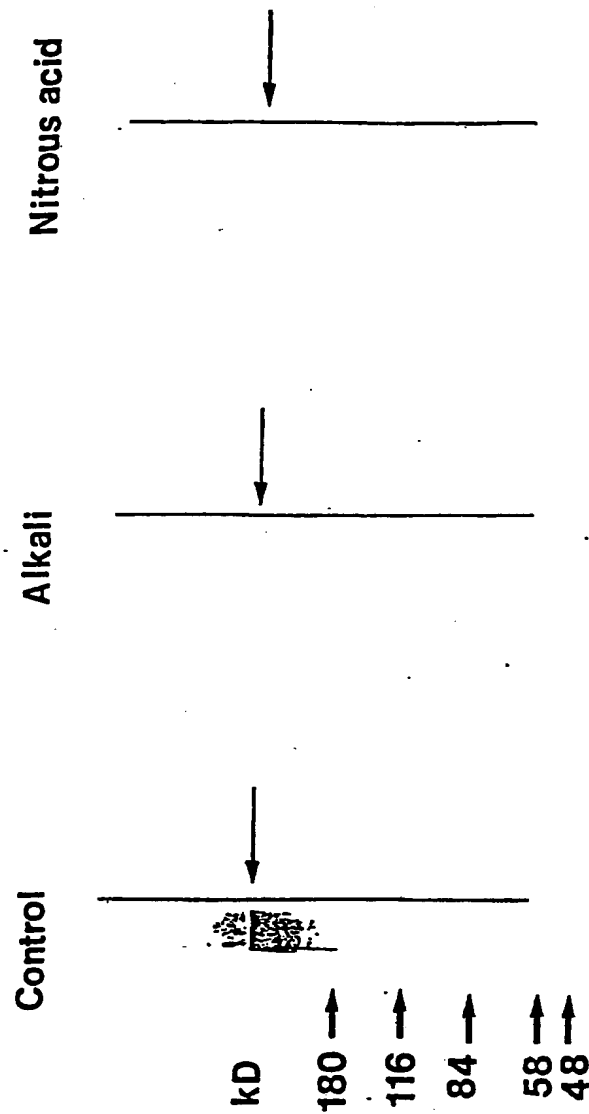


Abb. 4: Immunblot von Rattenhirnextrakten nach SDS-Gelelektrophorese. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verschwindet die Immunreaktivität nach HNO_2 (Nitrous Acid) Behandlung.

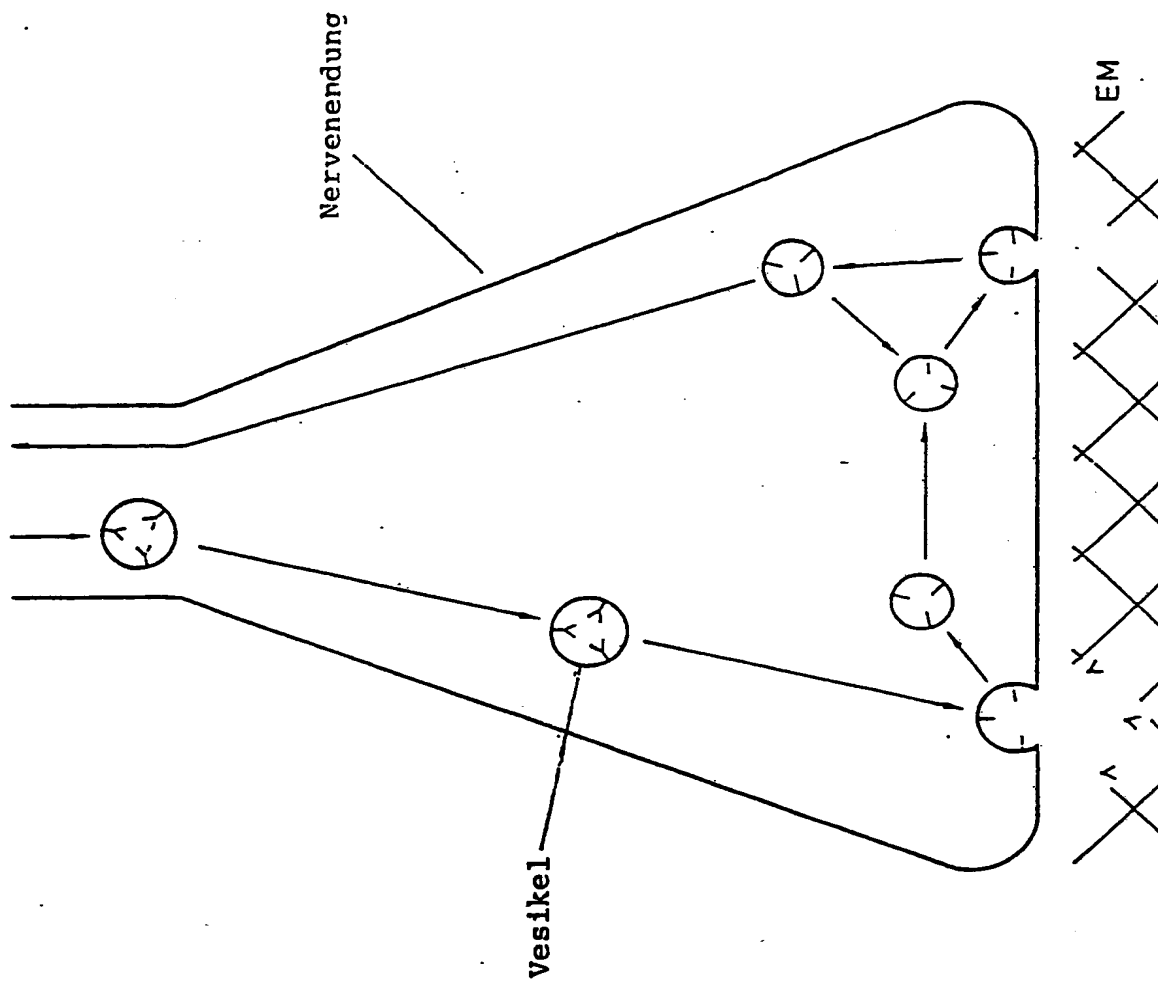
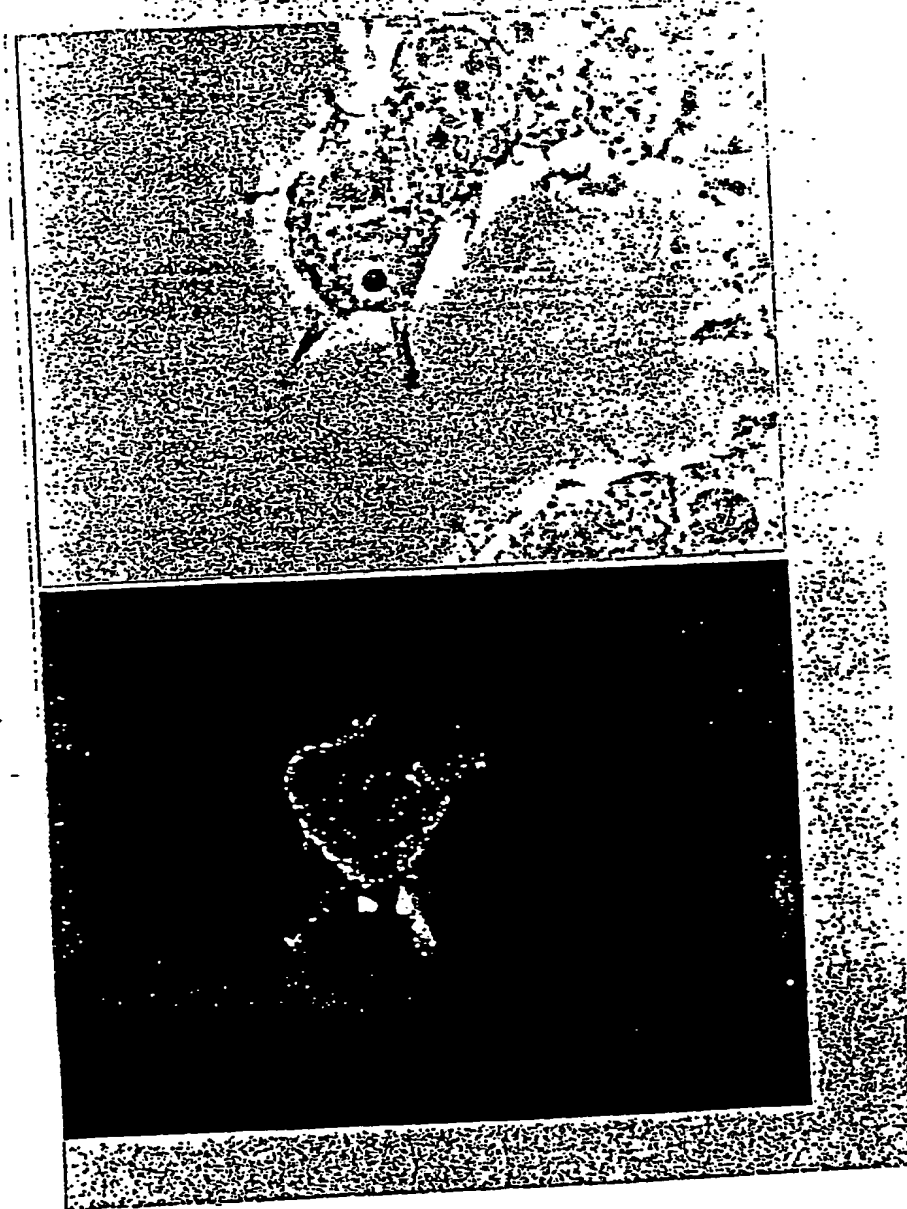


Abb. 5: Freisetzung von SG aus einer Nervenendigung y SG membrangebunden, < SG löslich

6/7



a

b

Abb. 6: PC12 Zellen

a: Phasenkontrast

b: Immunfärbung mit m AG-SG

BEST AVAILABLE COPY

1 2 3 4 5

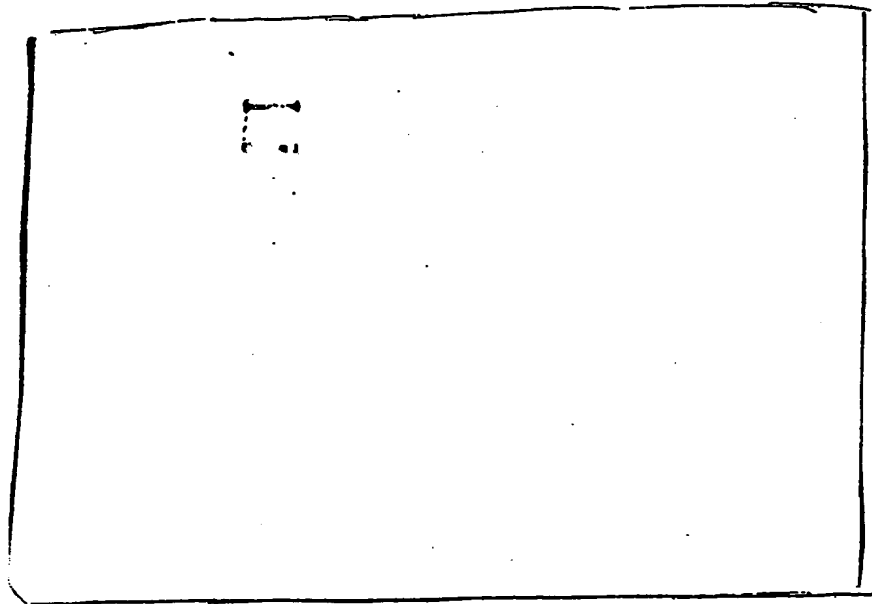


Abb. 7: Immunblots von Liquorproben verschiedener Patienten mit neurologisch manifesten Befunden: 1. Antikörper in AG-SG, 2. Antikörper Anti-Maus Immunglobuline-Peroxidase markiert.

Spuren 1, 3, 5 Liquor

Spuren 2, 4 Kontrollen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/EP 89/01585**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ G 01 N 33/53, C 07 K 15/14		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	G 01 N; C 07 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Journal of Neurocytology, volume 15, 1986 C.F. Eldridge et al: "Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies", see page 37 - page 51	1-19
--		
A	American Journal of Pathology, volume 133, Nr. 3, December 1988 A.D. Snow et al: "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease", see page 456 - page 463	1-19
--		
./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
5 April 1990 (04.05.90)	18 April 1990 (18.04.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 1985)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	J.Exp. Med., volume 163, May 1986 A.Miettinen et al: "Antibodies to basement membrane heparan sulfate proteoglycans bind to the laminae rarae of the glomerular basement membrane (GBM) and induce subepithelial GBM thickening", see page 1064 - page 1084	1-19
A	Biochem. J., volume 187, 1980 J. Wieslander et al: "Immunochemical analysis of cartilage proteoglycans", see page 687 - page 694	1-19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 89/01585**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben). ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC IPC5: G 01 N 33/53, C 07 K 15/14											
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; text-align: center;">IPC5</td> <td style="padding: 5px;">G 01 N; C 07 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen.⁸ </div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	IPC5	G 01 N; C 07 K					
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole										
IPC5	G 01 N; C 07 K										
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch-Nr.¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;"> Journal of Neurocytology, Band. 15, 1986 C.F. Eldridge et al: "Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies", siehe Seite 37 - Seite 51 <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;"> American Journal of Pathology, Band. 133, Nr. 3, Dezember 1988 A.D. Snow et al: "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease", siehe Seite 456 - Seite 463 <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-19</td> </tr> </table> <div style="font-size: small; margin-top: 10px;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch-Nr. ¹³	X	Journal of Neurocytology, Band. 15, 1986 C.F. Eldridge et al: "Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies", siehe Seite 37 - Seite 51 <div style="text-align: center;">--</div>	1-19	A	American Journal of Pathology, Band. 133, Nr. 3, Dezember 1988 A.D. Snow et al: "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease", siehe Seite 456 - Seite 463 <div style="text-align: center;">--</div>	1-19
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch-Nr. ¹³									
X	Journal of Neurocytology, Band. 15, 1986 C.F. Eldridge et al: "Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies", siehe Seite 37 - Seite 51 <div style="text-align: center;">--</div>	1-19									
A	American Journal of Pathology, Band. 133, Nr. 3, Dezember 1988 A.D. Snow et al: "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease", siehe Seite 456 - Seite 463 <div style="text-align: center;">--</div>	1-19									
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 5. April 1990 </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 18. 04. 90 </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> Mme N. KUIPER </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 5. April 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 18. 04. 90	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> Mme N. KUIPER </div>					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 5. April 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 18. 04. 90										
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> Mme N. KUIPER </div>										

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. Exp. Med., Band. 163, Mai 1986 A. Miettinen et al: "Antibodies to basement membrane heparan sulfate proteoglycans bind to the laminae rarae of the glomerular basement membrane (GBM) and induce subepithelial GBM thickening", siehe Seite 1064 - Seite 1084	1-19
A	Biochem. J., Band. 187, 1980 J. Wieslander et al: "Immunochemical analysis of cartilage proteoglycans", siehe Seite 687 - Seite 694	1-19